

# Minitest 4

- Ein Streuversuch ist durch folgende Parameter charakterisiert: Stoßparameter  $b=1 \times 10^{-10} \text{ m}$ , Streuquerschnitt  $\sigma = \pi \times 10^{-28} \text{ m}^2$ . Wie groß ist der Streuwinkel  $\vartheta$ ?

## Photoactivated Localization Microscopy

**Photoactivated Localization Microscopy** (PALM) beziehungsweise **Stochastic Optical Reconstruction Microscopy** (STORM) sind spezielle Methoden der Lichtmikroskopie, genauer der Fluoreszenzmikroskopie. Sie beruhen auf einem lichtgesteuerten Ein- und Ausschalten von Fluoreszenz in einzelnen Molekülen. Das Ein- und Ausschalten erfolgt dabei über einen gewissen Zeitraum hinweg, über den viele einzelne Bilder aufgenommen werden. Durch eine anschließende Computerberechnung lässt sich die Position einzelner Moleküle mit einer Auflösung jenseits der von Ernst Abbe beschriebenen optischen Auflösungsgrenze bestimmen.

Die Technik wurde 2006 von zwei Gruppen parallel entwickelt und unterschiedlich bezeichnet. Eric Betzig und Kollegen am Howard Hughes Medical Institute nannten sie PALM, Xiaowei Zhuang und Kollegen an der Harvard University nannten sie (STORM). Die erzielte Auflösung wurde mit 2 bis 25 nm bzw. 20 nm angegeben. <sup>[</sup>

### Funktionsprinzip

In der klassischen Fluoreszenzmikroskopie können fluoreszierende Moleküle, die zu nah beieinander liegen, nicht mehr aufgelöst werden: Sie erscheinen als eine einzige Struktur.

PALM umgeht dieses Problem, indem es sich die besonderen Eigenschaften von Photoaktivatable Fluorescent Proteins (PA-FPs) zu Nutze macht. Diese speziellen Varianten des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) können durch Licht bestimmter Wellenlänge und Intensität gezielt aktiviert und deaktiviert werden. Wie andere GFPs auch können sie molekularbiologisch an solche Proteine fusioniert werden, deren Position in der Zelle untersucht werden soll.

Zunächst sind alle PA-FPs inaktiv, also nicht fluoreszent. Durch einen kurzen Lichtblitz von 405 nm Wellenlänge werden zufällig einige wenige PA-FPs aktiviert. Dadurch können sie mit der „Detektionswellenlänge“ von 561 nm zur Fluoreszenz angeregt und fotografiert werden. Bei fortschreitender Belichtung bleichen diese Fluoreszenzmoleküle aus, das heißt die Fähigkeit zur Fluoreszenz geht in diesem Molekül unwiederbringlich verloren. Dabei werden fortlaufend weitere Bilder gemacht. Die Versuchsbedingungen werden so gewählt, dass die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Aktivierungsblitz zwei dicht nebeneinander liegende Moleküle gleichzeitig aktiviert werden, sehr klein ist. Da zu dicht liegende fluoreszierende Moleküle nicht von einander unterschieden werden könnten, ist dies eine Voraussetzung für die hohe Auflösung im Nanometerbereich.

Ein nächster Lichtblitz aktiviert wieder zufällig einige PA-FPs und der Vorgang wiederholt sich. Nach sehr vielen Durchgängen sind alle PA-FPs ausgebleicht und fotografiert.

Die fluoreszierenden Moleküle erscheinen aufgrund der Beugung des Mikroskopes zunächst verschwommen. Durch einen mathematischen Algorithmus unter Anwendung der Punktspreizfunktion kann jedoch die genaue Position jedes Moleküls berechnet werden. Ein Computerprogramm führt dies für alle Teilbilder durch und erzeugt daraus das endgültige Bild.

# Elektronenmikroskop

Die erste auf magnetischen Kräften beruhende Linse wurde 1926 von Hans Busch entwickelt. Als erstes Elektronenmikroskop wurde 1931 ein TEM von Ernst Ruska und Max Knoll gebaut, wenngleich zunächst keine elektronentransparenten Objekte, sondern testweise kleine Metallgitter abgebildet wurden. Für diese Arbeit erhielt Ruska 1986 den Physik-Nobelpreis. Er entwickelte auch bei Siemens 1938 das erste kommerzielle Elektronenmikroskop.

Die Kontrastierung biologischer Objekte mit Osmiumsäure schlug Ladislaus Marton 1934 vor. Das erste STEM wurde 1937 von Manfred von Ardenne gebaut.

Während in den frühen Jahren die Aufklärung der lichtmikroskopisch unsichtbaren Krankheitserreger (Viren) eine bedeutende Triebfeder für die Entwicklung des Elektronenmikroskops war, erweiterte sich das Interesse später besonders auf die Materialwissenschaft, nachdem Robert D. Heidenreich 1949 die Präparation dünner durchstrahlbarer Metallfolien gelang.

In den 1960er Jahren entwickelte man TEM mit immer höherer Beschleunigungsspannung (bis zu 3 MV, um 1965 in Toulouse, 1970 in Ōsaka), vor allem um dickere Objekte durchstrahlen zu können. In diesem Jahrzehnt wurde auch erstmals atomare Auflösung erreicht.

Ende der 1960er führte Albert Crewe den Feldemitter für STEM ein und verhalf dieser Technik damit erst zu ihrer Bedeutung.

Ende der 1980er Jahre wurde das ESEM entwickelt. Seit Ende der 1980er Jahre werden Schottky-Feldemitter in TEM eingesetzt. Seit Anfang der 1990er Jahre kommen FESEM mit Schottky-Feldemitter zum Einsatz.

Erwähnenswert ist auch der zunehmende Einsatz von Computern seit den 1990er Jahren. So lassen sich beispielsweise komplizierte Linsensysteme automatisch durch Analyse der Aufnahmen einer CCD-Kamera justieren, was den Benutzer des Mikroskops deutlich entlastet. Unabdingbar ist der Einsatz von Computern zur Kompensation von Aberrationen der elektronenoptischen Linsen mit magnetischen Multipollinsen, eine Technik, die in den letzten Jahren sowohl im REM, TEM, wie auch im STEM-Bereich immer mehr Bedeutung erlangt.

Anfang 2008 wurde ein neues Transmissionselektronenmikroskop mit Aberrationskorrektur, „TEAM“ genannt, angekündigt<sup>[2]</sup>. Es weist eine Auflösung von 0,05 Nanometern auf.

Im Dezember 2008 wurde vom Forschungszentrum Jülich der Bau eines 15 Millionen Euro teuren Elektronenmikroskops am Ernst Ruska-Centrum für Mikroskopie und Spektroskopie angekündigt. Mit einer Auflösung von ebenfalls 0,05 Nanometern wird es zu den auflösungsstärksten Mikroskopen der Welt gehören.